

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Japanese Patent Laid-Open No. 264027/92 (JP 4264027)  
based on Japanese Patent Application No. 108977/81 cited as  
JP 4264027 in the office action mailed April 4, 2001 in U.S.  
Patent Application Serial No. 09/221,931

VERIFICATION OF TRANSLATION

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks  
Washington, DC 20231

MAY 07 2002

RECEIVED

TECH CENTER 1600/2900

Sir:

I, Jun NAKAGAWA of 3-7-21, Shibayama, Funabashi-shi,  
Chiba-ken, Japan, declare

(1) that I know well both the Japanese and English  
languages;

(2) that I translated the above-identified reference  
from the Japanese to English;

(3) that the attached English translation is a true and  
correct translation of the relevant parts of the  
specification of the above-identified reference to the best  
of my knowledge and belief; and

(4) all statements made of my own knowledge are true  
and that all statements made on information and belief are  
believed to be true; and further that these statements are  
made with the knowledge that willful false statements and the  
like are punishable by fine or imprisonment, or both, under  
Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that  
such willful false statements may jeopardize the validity of  
the above application or any patent issued thereon.

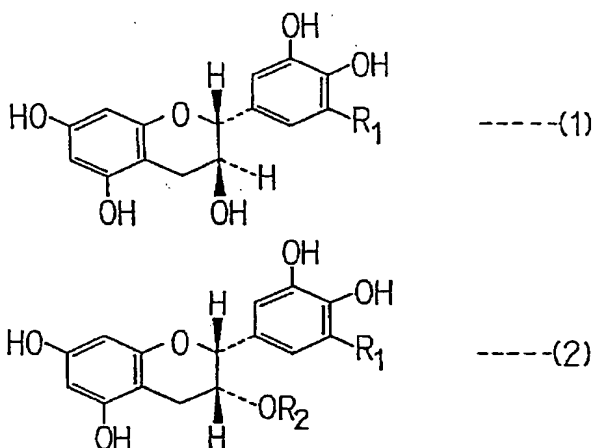
April 25, 2002  
Date

Jun Nakagawa  
Jun NAKAGAWA

Translation of the relevant parts of JP 4264027

<Claims>

<Claim 1> A composition for prevention of colon cancer of this reference comprises polyphenols represented by the formula (1) and/or (2):



wherein R<sub>1</sub> represents hydrogen atom or a hydroxyl group and R<sub>2</sub> represents hydrogen atom or 3,4,5-trihydroxybenzoyl.

<0010>

<Forms for Uses>

The composition for prevention of colon cancer according to the present invention is preferably formed in the form of foods including various confectioneries and beverages. As the components used to produce these foods, various food materials and food additives are used according to its purposes and forms for its uses. For example, those are combined appropriately which include coloring agents, sweeteners, enzymes, thickening and stabilizing agents, gum bases, coating agents, bitters, antioxidants, seasonings, enrichments, additives for production, preservatives, flavor-fixing agents, acidity-providing agents, oils, binders, spices, dairy products, serials, purified proteins, microorganism preparations, nutrient enrichments and the like. The polyphenols as the active components of the present invention is effective for prevention of colon cancer at a dose of 300 to 600mg/day to a human adult of 60kg weights. Therefore, regarding the amount of the food to be eaten and the final form of the food such as its external appearance and taste, the content of the polyphenols in the composition for prevention of colon cancer according to the present invention is preferably from

0.05 to 0.7% and more preferably from 0.3 to 0.5%. When it is less than 0.05%, a large amount of intake of the composition for prevention of colon cancer according to the present invention is required, while, when it is more than 0.7%, the external appearance and taste of the final products is spoiled and it becomes difficult to achieve the object of the present invention that "the composition can be taken naturally by diet in every day life". Further, regarding intervals for intake of the composition for prevention of colon cancer according to the present invention, it is preferred that a necessary daily intake amount calculated based on the weight of each person is taken daily.

<0011>

<Function>

The function of the polyphenols as the active components in the present invention is explained in detail by mentioning the test examples below.

#### Test Example 1

Fisher rats (male, 8 weeks of age) were bred a MF solid feed as a product of Oriental Yeast Co. Ltd. and water, and initiation was carried out by subcutaneous injection of 7.4mg/kg of azoximethane (a product of Sigma) once per week from the first week to the tenth week. These rats were divided into three groups to set a control group (26 rats), a test group (26 rats) and a comparative group (26 rats), respectively. During the 11 week and the 26 week, the control group was fed continuously by water, while the test group and the comparative group were fed by water containing 0.01% of polyphenols of Example 1 and water containing 0.01% of a tea extract by hot water, respectively. A group (10 rats  $\times$  3) which was set, which was fed in the same manner as the above groups except that the group was not treated by azoximethane. After 26 weeks, they were dissected for test and colon cancer was searched. Student' t-test and  $\div 2$  - test were used for determination of the rate of tumor occurrence and tumor number per a rat. The results are shown in Table 2

<0012>

Table 2

Groups in Experimentns (Effective rat number)	Control Group(21)	Group with administration of polyphenols of Example 1 (21)	Group with administration of a tea extract by hot water (22)
Tumor number per one rat (Average $\pm$ standard deviation)	1.5 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2*	1.1 $\pm$ 0.2
Rate of tumor occurrence	81	38*	68

The value with \* is significant with  $P < 0.01$  against the control group.

<0013>

In addition, no tumor occurrence was observed in the 3 groups without the azoximethane treatment.

<0014>

#### Test Example 2

Fisher rats (male, 8 weeks of age) were bred a MF powder feed as a product of Oriental Yeast Co. Ltd. and water, and initiation was carried out by subcutaneous injection of 7.4mg/kg of azoximethane (a product of Sigma) once per week from the first week to the tenth week. These rats were divided into three groups to set a control group (30rats), a test group (30rats) and a comparative group (30rats), respectively. During the 11 week and the 26 week, the control group was fed continuously by the MF powder feed water, while the test group and the comparative group were fed by a MF powder feed containing 0.015% of polyphenols of Example 1 and a MF powder feed containing 0.015% of a commercially sold tea powder, respectively. A group (10 rats  $\times$  3) which was set, which was fed in the same manner as the above groups except that the group was not treated by azoximethane. After 26 weeks, they were dissected for test and colon cancer was searched. Student's t-test and  $\chi^2$ -test were used for determination of the rate of tumor occurrence and tumor number per a rat. The results are shown in Table 3

<0015>

Table 3

Groups in Experimentns	Control	Group with	Group with
------------------------	---------	------------	------------

(Effective rat number)	Group(25)	administration of polyphenols of Example 1 (26)	administration of a tea extract by hot water (25)
Tumor number per one rat (Average $\pm$ standard deviation)	$1.7 \pm 0.2$	$0.5 \pm 0.1^*$	$1.2 \pm 0.2$
Rate of tumor occurrence	84	35*	76

The value with \* is significant with  $P < 0.001$  against the control group.

<0016>

In addition, no tumor occurrence was observed in the 3 groups without the azoximethane treatment.

<0017>

As is clear from the above test examples 1 and 2, the polyphenols as the active components in the present invention can significantly prevent colon cancer at a concentration in water to drink or a feed between 0.01 and 0.015%. When these effective amounts were converted into those for a human adult with 60kg weight, the effective amounts correspond to about 300 to about 600 mg/day and the composition for prevention of colon cancer can be taken naturally as diet in every day life.

<0018>

<Example>

Example 1

Three liters of water was added to 300g of commercially available green tea and stirred at intervals to carry out extraction for 1 hour at 75 °C. The extract solution was filtered and the aqueous layer was obtained. After three liters of ethyl acetate was added and stirred violently, the solution was allowed to stand overnight. The ethyl acetate layer was dried to solid state under reduce pressure and charged to silica gel chromatography (8cm  $\times$  70cm, 1.5kg) and eluted by 20:1 and 10:1 (v/v) of a chloroform - methanol solvent in this order. The eluate by the 10:1 chloroform - methanol solvent was dried to solid state under reduced pressure and thus polyphenols with 93% purity was obtained. This content of the polyphenols was represented by the official tannin analysis method.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-264027

(43) 公開日 平成4年(1992)9月18日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
A 6 1 K 31/35  
// C 0 7 D 311/62

識別記号  
A D U

庁内整理番号  
7475-4C  
6701-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数2(全5頁)

(21) 出願番号 特願平3-108977

(22) 出願日 平成3年(1991)2月16日

(71) 出願人 000204181

太陽化学株式会社

三重県四日市市赤堀新町9番5号

(72) 発明者 萩原 宣行

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72) 発明者 立石 雅也

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72) 発明者 赤地 重光

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

最終頁に続く

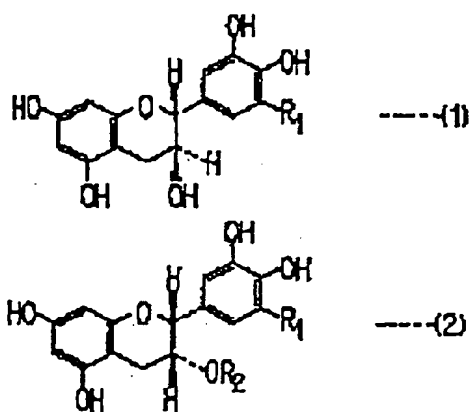
(54) 【発明の名称】 大腸癌予防用組成物

(57) 【要約】

\*リフェノール類を有効成分とする大腸癌予防用組成物。

【構成】 式(1)及び/又は式(2)で表わされるホ\*

【化1】



(式中、R<sub>1</sub> は水素原子又はヒドロキシ基を示し、R<sub>2</sub> は水素原子又は3, 4, 5-トリヒドロキシベンゾイル基を示す。)

【効果】 本発明の組成物は、安全性が高く、優れた大腸癌予防効果を有しており、日常の食生活に適宜取り入れて無理なく摂取できる。

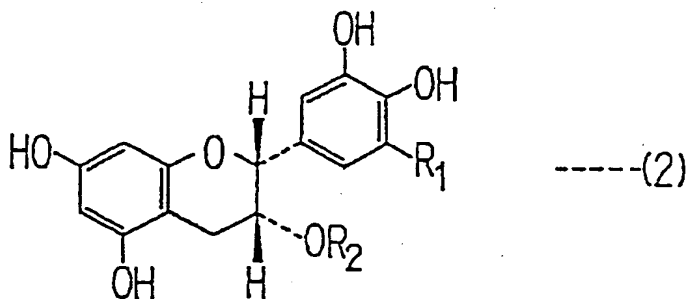
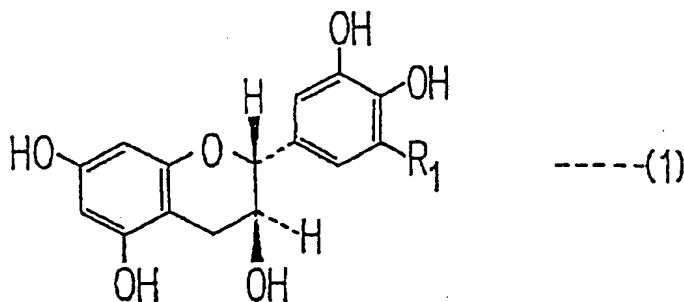
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(1)及び/又は式(2)で表されるポリフェノール類を有効成分として含有することを特徴\*

\*とする大腸癌予防用組成物。

【0001】

【化1】



【0002】 (式中、R<sub>1</sub>は水素原子又はヒドロキシル基を示し、R<sub>2</sub>は水素原子又は3, 4, 5-トリヒドロキシベンゾイル基を示す。)

【請求項2】 有効成分の含有率が0.05~0.7%である請求項1の大腸癌予防用組成物。

【0003】

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】 本発明は大腸癌予防用組成物に関する。

【0004】

【従来の技術】 近年、食生活の欧米化に伴い大腸癌の罹患率が急増しており、近い将来その死亡率は胃癌を抜いて1位を占めることが予測されている。従って、日常の食生活において、大腸癌の予防に有効な食品の摂取を励行することは、将来的に国民の癌死亡率を低下させるために効果的な方法である。今日、大腸癌の予防に有効な食品成分として食物繊維が挙げられているが、これの過剰摂取は腹部の充満感や下痢を伴う等少なからず問題がある。

【0005】 又、茶のポリフェノール類は、動物実験において経口投与により乳腺(原ら、第43回日本癌学会総会記事、1984年、280頁)、食道・前胃(小国ら、日本農芸化学会誌、1990年、288頁)、十二指腸[藤田ら、ジャパニーズジャーナルオブキャンサーリサーチ(Japanese journal of cancer research)、第80巻、503~505頁]の発癌抑制や、20-メチルコラントレン誘

発肉腫の増殖抑制(特開昭60-190719、原ら、日本栄養・食糧学会誌、第42巻、39~45頁)等、ある種の癌に予防効果を有することが最近の研究から示唆されている。しかし、十二指腸癌以外の前記試験例における投与量は、ヒトに換算すると約10g/60kg/日以上以上の摂取量となり、茶のポリフェノール類が有する渋みを考慮にいれると、このような多量のポリフェノール類を日常の生活に取り入れることは極めて困難である。更に、十二指腸癌はヒトではほとんど発生しない等の理由で、茶のポリフェノール類を癌予防の目的に利用した例は今だ知られていない。

【0006】

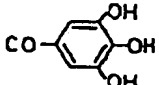
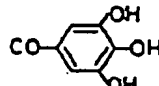
【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は上記の実状に鑑み、安全かつ低濃度で優れた大腸癌予防効果を有し、日常の食生活に適宜取り入れて無理なく摂取できる大腸癌予防用組成物を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、茶(Camellia sinensis, (L.) O. Kuntze)に含まれるポリフェノール類が、意外にも低濃度で大腸癌の予防に有効であることを見出し、本物質を有効成分とする安全性の高い、優れた大腸癌予防用組成物を得ることに成功した。本発明のポリフェノール類は、表1に示した6種類の主要な化合物よりなる。

【0008】

【表1】

	式	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	一般名
化合物 I	(1)	H	—	(+)—カテキン
化合物 I	(2)	H	H	(-)—エピカテキン
化合物 II	(1)	OH	—	(+)—ガロカテキン
化合物 II	(2)	OH	H	(-)—エピガロカテキン
化合物 V	(2)	H		(-)—エピカテキン ガレート
化合物 VI	(2)	OH		(-)—エピガロカテキン ガレート

【0009】本発明に用いられるポリフェノール類の典型的調製法は、本発明者等が先に出願した特許（特開昭64-90124）に詳細に例示される。このようなポリフェノール類は、我々が日常飲用に供している茶の成\*

ddy マウス雄 LD<sub>50</sub> > 3000mg/kg（経口）

ddy マウス雌 LD<sub>50</sub> > 3000mg/kg（経口）

尚、LD<sub>50</sub>値はリッチフィールド・ウィルコクソン法により算出した。

#### 【0010】〈使用形態〉

本発明のポリフェノール類を有効成分として含有する大腸癌予防用組成物は、種々の菓子類、飲料を含む食品の形態とすることが好ましい。これらの食品を製造するのに用いられる成分としては、使用目的、使用形態等に応じて種々の食品素材、食品添加物が用いられる。例えば、着色料、甘味料、酵素、増粘安定剤、ガムベース、被膜剤、苦味料、酸化防止剤、調味料、強化剤、製造用剤、保存料、着香料、酸味料、油脂、結着剤、香辛料、乳製品、穀物、精製タンパク、微生物製剤、栄養強化剤等が適宜配合される。本発明の有効成分であるポリフェノール類は、体重60kgのヒト成人に300～600mg/日の投与量で大腸癌予防効果を発揮する。従って、1日当りの食事量と最終製品の仕上り（外観、味）を考慮すると、本発明の大腸癌予防用組成物中のポリフェノール類含有率は0.05～0.7%が適当であり、より好ましくは0.3～0.5%である。0.05%未満の場合は、本発明の大腸癌予防用組成物の多量摂取を要し、一方、0.7%を超える場合は、最終製品の外観と味が著しく損なわれ、本発明の「日常の食生活において無理なく摂取できる」という目的を達成することは難しくなる。又、本発明の大腸癌予防用組成物の摂取間隔

\*分として多量に含まれていることから、安全であることは歴史的に証明されている。参考として、後述する実施例1の方法により調製したポリフェノール類の急性毒性試験の結果を以下に記載する。

については、各人の体重に応じて算定した1日の必要量を毎日摂取することが好ましい。

#### 【0011】

【作用】本発明の有効成分であるポリフェノール類の作用を、以下に試験例を挙げて詳細に説明する。

#### 試験例1.

Fisher系ラット（雄、8週齢）をオリエンタル酵母（株）社製MF固型飼料及び水道水で飼育し、第1週から10週までアゾキシメタン（シグマ社）を週1回、7.4mg/kg皮下投与し、イニシエーションを行った。これらのラットを3群に分け、各々対照群（26匹）、試験群（26匹）、比較群（26匹）とした。対照群は引き続き水道水で、試験群は実施例1のポリフェノール類を0.01%含む水道水で、比較群は茶の熱水抽出物を0.01%含む水道水で11週から26週目まで飼育した。又、アゾキシメタン無処理であることを除き、上記3群と同じ条件にて飼育した群（10匹×3）も設定した。26週後剖検し、大腸癌を検索した。腫瘍発生率及びラット1匹当りの腫瘍数の検定には、それぞれスチューデントのt-検定、 $\chi^2$ -検定を用いた。その結果を表2に示す。

#### 【0012】

#### 【表2】

5

6

実験群 (有効ラット匹数)	対照群 (21)	実施例1のポリフェ ノール類投与群 (21)	蒸熱水抽出物投与群 (22)
ラット1匹当りの 腫瘍数 (平均±標準誤差)	1.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2 <sup>*</sup>	1.1 ± 0.2
腫瘍発生率(%)	81	38 <sup>*</sup>	68

<sup>\*</sup>の付いた値は対照群に対し、 $P < 0.01$ で有意差有り。

【0013】尚、アゾキシメタン無処理の3群には腫瘍発生はなかった。

【0014】

【試験例2】Fisher系ラット(雄、8週齢)をオリエンタル酵母(株)社製MF粉末飼料及び水道水で飼育し、第1週から10週までアゾキシメタン(シグマ社)を週1回、7.4mg/kg皮下投与し、イニシエーションを行った。これらのラットを3群に分け、各々対照群(30匹)、試験群(30匹)、比較群(30匹)とした。対照群は引続きMF粉末飼料で、試験群は\*

\*実施例1のポリフェノール類を0.015%含むMF粉末飼料で、比較群は市販の抹茶を0.015%含むMF粉末飼料で11週から26週目まで飼育した。又、アゾキシメタン無処理であることを除き、上記3群と同じ条件にて飼育した群(10匹×3)も設定した。26週後剖検し、大腸癌を検索した。腫瘍発生率及びラット1匹当りの腫瘍数の検定には、それぞれスチューデントのt-検定、 $\chi^2$ -検定を用いた。その結果を表3に示す。

【0015】

【表3】

実験群 (有効ラット匹数)	対照群 (25)	実施例1のポリフェ ノール類投与群 (26)	抹茶投与群 (25)
ラット1匹当りの 腫瘍数 (平均±標準誤差)	1.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1 <sup>*</sup>	1.2 ± 0.2
腫瘍発生率(%)	84	35 <sup>*</sup>	76

<sup>\*</sup>の付いた値は対照群に対し、 $P < 0.001$ で有意差有り。

【0016】尚、アゾキシメタン無処理の3群には腫瘍発生はなかった。

【0017】前記試験例1、2から明らかなごとく、本発明の有効成分であるポリフェノール類は飲水或いは食餌中0.01~0.015%の濃度で大腸癌を有意に抑制することができる。この有効量を体重60kgのヒト成人に換算すると約300~600mg/日となり、日常の食生活において本発明の大腸癌予防用組成物を無理なく摂取することができる。

【0018】

【実施例】実施例1.

市販の緑茶300gに水を約3l加え時々攪拌し、75℃で1時間抽出した。抽出液をろ過して水層を得、酢酸エチル3lを加えて激しく攪拌後、一晚放置した。酢酸

エチル層を減圧乾固後、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(8cm×70cm, 1.5kg)に付し、20:1、次いで10:1(V/V)のクロロホルム-メタノールの溶媒にて順次溶出した。10:1(V/V)のクロロホルム-メタノール溶出液を減圧乾固後、純度93%のポリフェノール類を20g得た。尚、ポリフェノール類の含量は、公定タンニン分析法をもって表した。

【0019】実施例2. コーヒー乳飲料

脱脂乳860mlを35℃に加温後、砂糖39.9g、コーヒーシロップ97g、カラメル2g、香料1g、実施例1のポリフェノール類4gを攪拌しながら順次加え、ポリフェノール類を0.4%含むコーヒー乳飲料を作製した。実施例3. クッキーバター120gをクリー

7

ミングし、砂糖119g及び実施例1のポリフェノール類2.4gを加えて十分クリーミングする。これに全卵50gを加えてさらにクリーミングし、予め混合しておいた小麦粉302g、重曹1.35g、クエン酸0.68gを加え、軽く混合して生地とする。生地を絞り袋に入れて成形、160℃、12分間焙焼しポリフェノール類を0.4%含むクッキーを作成した。

【0020】

【発明の効果】前記試験例から明らかなごとく、本発明の大腸癌予防用組成物は優れた効果を有している。又、原料として用いる茶は古来から飲用として供されてお

8

り、かつ前記急性毒性試験例から明らかなごとく、安全性が高いので、日常の食生活に本発明の大腸癌予防用組成物を適宜取り入れて長期摂取しても何ら問題はない。更に、茶は入手が容易で実用上も適切な原料であり、又、本発明の有効成分であるポリフェノール類を得る方法が極めて簡単で大量に操作できる方法であることから、本発明は効果の高い大腸癌予防用組成物を大量かつ安価に供給することが可能である。従って、国民の健康増進に貢献することは勿論、産業的にも極めて有用である。

10

---

フロントページの続き

(72)発明者 金 武▲祚▼

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72)発明者 山根 哲郎

京都市北区西賀茂上庄田町5の21

(72)発明者 高橋 俊雄

京都市左京区修学院桧峠町6-5